

**PRODUCTION OF POLY-3-HYDROXYBUTYRIC ACID**

Patent Number: JP7155192  
Publication date: 1995-06-20  
Inventor(s): MINAGAWA SHUNICHIRO; others: 03  
Applicant(s): MITSUBISHI GAS CHEM CO INC  
Requested Patent: ☐ JP7155192  
Application Number: JP19930310731 19931210  
Priority Number(s):  
IPC Classification: C12P7/62  
EC Classification:  
Equivalents:

**Abstract**

**PURPOSE:** To stably obtain poly-3-hydroxybutyric acid excellent in biodegradability and biocompatibility on a large scale according to a simple method by culturing a methanol-assimilating bacterium having the ability to produce the poly-3-hydroxybutyric acid under specific conditions using methanol as a carbon source.

**CONSTITUTION:** This method for producing poly-3-hydroxybutyric acid (PHB) is to culture a methanol-assimilating bacterium having the ability to produce the PHB, e.g. *Protomonas extorquens* K (FERM P-8395) at a low pH using methanol as a carbon source and the culture pH as a limiting factor for the growth. Thereby, the PHB content in the microbial cell is increased. The average residence time in a culture tank is preferably  $\geq 15$  hr.

Data supplied from the esp@cenet database - 12

**BEST AVAILABLE COPY**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-155192

(43) 公開日 平成7年(1995)6月20日

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>

C 1 2 P 7/62

識別記号

庁内整理番号

7432-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平5-310731

(22) 出願日 平成5年(1993)12月10日

(71) 出願人 000004466

三菱瓦斯化学株式会社

東京都千代田区丸の内2丁目5番2号

(72) 発明者 皆川 俊一郎

新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱

瓦斯化学株式会社新潟研究所内

(72) 発明者 今川 茂樹

新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱

瓦斯化学株式会社新潟研究所内

(72) 発明者 寺尾 巖

新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱

瓦斯化学株式会社新潟研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリ-3-ヒドロキシ酪酸の製造法

(57) 【要約】

【構成】 ポリ-3-ヒドロキシ酪酸を生産する能力を有するメタノール資化性細菌を、メタノールを炭素源とし、培養pHが増殖の制限因子となるように培養しポリ-3-ヒドロキシ酪酸を菌体内に蓄積させ、これを回収する。

【効果】 本発明によるポリ-3-ヒドロキシ酪酸の生産は、培養pHを低下させるだけの簡単な操作で高収率にポリ-3-ヒドロキシ酪酸を生産することができる。さらに原料がメタノールであるので、原料コストが安く、また雑菌汚染の心配がない。したがって、ポリ-3-ヒドロキシ酪酸を大規模に、しかも経済的かつ安定的に生産することが可能となる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ポリ-3-ヒドロキシ酪酸を生産する能力を有するメタノール資化性細菌を、メタノールを炭素源として培養することにより、該菌体内にポリ-3-ヒドロキシ酪酸を合成蓄積させ、当該菌体からポリ-3-ヒドロキシ酪酸を取得するポリ-3-ヒドロキシ酪酸の製造法において、培養pHが増殖の制限因子となるような低pH培養をすることを特徴とするポリ-3-ヒドロキシ酪酸の製造法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はポリ-3-ヒドロキシ酪酸（以下PHBと記す）の製造法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 PHBは、エネルギー貯蔵物質として数多くの微生物の菌体内に生成、蓄積され、優れた生物分解性と生体適合性を示す熱可塑性高分子であることから、環境にやさしい“クリーン”プラスチックとして注目され、手術糸や骨折固定用材などの医用材料および医薬や農薬を徐々に放出する徐放性システムなどの多方面への応用が永年にわたり期待されてきた。特に、近年、合成プラスチックが環境汚染や資源環境の観点から深刻な社会問題になるに至り、PHBは石油に依存しないバイオポリマーとして注目され、これまでにPHBの製造法がいくつか報告されている（特公昭63-32438、特公平5-997、特公平02-20238、特公平03-65154）。これらの公報には、炭素源（以後、基質ともいう）としてグルコースを用いて、アルカリゲネス属の菌体を、窒素あるいはリンを制限する方法による増殖制限条件下で連続培養することによりPHBを製造する方法（特公平02-20238）や、アゾバクター属、プロトモナス属の菌体をアルカリゲネス属の菌体の場合と同様に増殖制限条件下で回分培養することによりPHBを製造する方法（特公平5-997、特公平03-65154）などが記載されているが、これらの方法は生産コストが高いなど工業的生産には不十分である。

【0003】 即ち、上記の発明では、菌体を増殖させるための主栄養素、すなわち炭素源が高価でPHBの製造コストを低く抑えることができなかったり、連続培養によるPHBの蓄積が不十分であったり、二段階培養を行うなど製造プロセスが複雑であるなどの欠点がある。

【0004】 原料（すなわち基質）のコストは、PHB生産の全体コストにおいて重要な要素である。グルコース、蔗糖等を原料とするPHBの生産法についての記載が特公平02-20238、特公昭63-32438にあるが、これらの方法ではPHB生産コストの昇が避けられない。安価なメタノールを基質とした培養法については、例えば特開昭56-117793号明細書の記載によれば、メタノールを基質としてメチロバクテリウ

ム オルガノフィラム種の微生物を第一の培養槽において栄養素を制限せずに連続的に培養する。この際、細胞内にはPHBの蓄積が生じない。次いで、第二の培養槽へ連続的に移送し第二の培養槽において窒素またはリンを増殖の律速因子として培養する。この際に初めて細胞内にPHBの蓄積が生じる。培養槽をシリーズで2槽用いて二段階培養を行う方法は、プロセスが複雑であることと満足のいくPHB含量を得られないことの欠点を有している。

10 【0005】 また、特公平02-20238号明細書中に、窒素制限下でメタノール基質でメチロバクテリウム オルガノフィラム NCIB 11483菌株を連続培養した記載があるが、この条件で達成された最高のPHB含有量は約11%と低いものである。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、従来技術における上記したような課題を解決し、安価なメタノールを資化し得る細菌を用いて、簡便な方法でPHBを大量にかつ安価に製造できる生産方法を提供すること

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、PHBを生産する能力を有するメタノール資化性細菌を用いて、安価に、かつ簡便にPHBを生産する方法を鋭意検討したところ、これらの細菌を培養する際の培養液のpHを、その細菌の増殖の至適pHより大幅に低いpHに維持することにより増殖を制限して培養を行ったときに、細胞の増殖と並行して多量にPHBを蓄積させ得ることを見だし、本発明に到達した。すなわち、本発明はPHBを生産する能力を有するメタノール資化性細菌を、メタノールを炭素源として培養し、該菌体中にPHBを合成蓄積させ、当該菌体からPHBを取得するPHBの製造法において、培養pHが増殖の制限因子となるような低pH培養をすることを特徴とするポリ-3-ヒドロキシ酪酸の製造法である。

【0008】 本発明において、PHBは  $-OCH(CH_3)_2CO-$  なる繰り返し単位から構成されるポリエステル物質である。本発明に使用される細菌は、PHBを生産する能力を有し、メタノール資化性を持つ細菌であればよく、たとえば、メチロバクテリウム属、キサントバクター属、ハイボミクロビウム属、パラコッカス属、メチロバチルス属およびアンキロバクター属の細菌などが挙げられるが、実用上メチロバクテリウム(Methylobacterium)属の細菌が好ましい。

【0009】 本発明の培養に用いられる培地は、炭素源、窒素源、および無機塩類を含有する通常の培地が用いられる。炭素源としてメタノールが用いられる。メタノールは純品であってもよく、粗製メタノールやメタノール含有廃棄物の使用も可能である。窒素源としては、使用する細菌が資化する物質であれば特に制限はな

く、例えばアンモニア、尿素、硝酸あるいは酵母エキス、麦芽エキスなどの有機窒素含有物が用いられる。無機塩類としてリン酸塩、カリウム塩、ナトリウム塩、硫酸塩およびマグネシウム、鉄、カルシウム、亜鉛、マンガ、コバルト、銅、モリブデン等の金属塩が用いられる。なお、使用する菌が資化し得る炭素化合物またはその含有物を炭素源としてメタノールと併用することを妨げない。

【0010】培養条件は、使用する菌株により異なるが、一般的には、温度は25～40℃、好ましくは30～38℃とされる。良好なPHB生産性を得る最適温度は、菌株により異なることが多い。このような条件で好氣的に培養されるが、そのために空気、又は酸素を通気し、かつ酸素を培養液に有効に溶け込ませるために必要に応じて攪拌する。一般的には培養液中の溶存酸素濃度は0.3ppm以上が望ましい。

【0011】培養槽の形式は、通気攪拌槽であればいずれでも使用可能であり、例えば機械的攪拌槽、エアリフト式培養槽および気泡塔型培養槽などを利用することができる。培地の供給方法は、炭素源、窒素源、各種無機塩類、各種添加剤などが、一括してあるいは個別に連続的あるいは間欠的に供給される。たとえば、メタノールは他の培地成分との混合物として培養槽に供給してもよく、また他の培地成分とは別に独立して培養槽に供給することもできる。培養液のpH制御は、通常アンモニアガス又はアンモニア水を用いて行われる。培地成分として菌体の増殖に必要な窒素を十分供給している場合には、非窒素系塩基、例えば苛性ソーダ、苛性カリなどを用いてpHを制御することもできる。

【0012】PHBの蓄積には通常、炭素源以外の培地成分を制限する方法が用いられる。窒素、リン、イオウ、カリ、および微量元素、例えばマンガ、亜鉛、銅などの成分を制限するのが好ましいとされている。本発明による培養は、これとはまったく異なり、培地成分は一切制限しないで行われる。培養は、回分、半連続および連続のいずれによっても行うことができる。すなわち回分培養では菌体が増殖するうえで必要とする培地成分を一括して、又は、菌体増殖に伴って段階的に流加するなどの方法が用いられる。連続培養では必要な培地成分を一定量連続的に供給する方法が用いられる。いずれの培養方法においても培地成分は一切制限されずに供給される。各ミネラル成分が不足なく供給されていることは、培養液中に存在する各ミネラルイオンを常法によりイオンクロマトグラフィにより連続的に測定する事により確認できる。

【0013】本発明は、回分、半連続および連続のいずれによることもできる。各培養法単独で、もしくは各培養法を組み合わせ（例えば、2槽の培養槽を用いて二段階培養を）行うことができる。本発明による回分培養もしくは流加培養を行う場合は、培養の始めから本発明

による低pHでの培養を開始してもよく、あるいは菌体濃度がある値まで上昇したのちに本発明による低pHでの培養を開始してもよい。培養の始めから本発明による低pHでの培養を行った場合は、菌体の増殖と並行してPHBの合成蓄積が行われる。通常用いられるpH領域で培養し菌体濃度がある値まで高めたのち、本発明による低pH培養に切り替えられた場合は、低pH培養を開始した後からPHBの合成蓄積が始まる。このように醗酵槽への酸素の供給や、増殖に必要な栄養素を制限することなく培養pHを低下するのみでPHBを合成蓄積させることは、これまでまったく知られてなく、驚くべきことである。

【0014】本発明におけるpHの設定は菌株により異なる。その菌株が最もよく生育する、すなわち比増殖速度が最も大きいpH（以後最適pHという）より培養pHを低下するに伴ないPHB含有量が上昇する傾向となる。培養pHと比増殖速度、PHB含有量の関係を調べた結果、比増殖速度を最大比増殖速度の30%以下に抑制するpHとしたときに、PHB含有量の顕著な増加が認められた。低pH域における比増殖速度の低下は著しく、過度の低pHの設定は望ましくない。

【0015】本発明の培養では、培養液中の残存メタノール濃度が一定となるようにメタノール供給量を制御する。工業的には培養液中の残存メタノール濃度をガスクロマトグラフィなどの分析計により経時的に測定し、その信号によりメタノール供給量を自動的に調節する方法がとられる。培養液中の残存メタノール濃度は通常は10～3000ppm程度、好ましくは200～2000ppm程度に維持される。残存メタノール濃度は、培養廃ガス中のメタノールを炭化水素計あるいは、ガスクロマトグラフィ等の分析計により測定することによっても知ることができる。この状態においては菌の増殖を制限しているのはpHのみである。

【0016】本発明を連続培養で行う場合は、以下により行われる。連続培養系で定常状態を保つ方法としては、基質の節約という立場から基質の供給速度を制限しながら培養する、いわゆる基質律速培養によるものが一般的であるが、本発明における培養法は前記の基質律速培養とは異なり、低pH条件にして比増殖速度を制限することにより定常状態を保ちながら培養を行う、すなわち増殖を制限する因子が唯一pHのみであるpH律速培養法である。本発明の連続培養に切り替えられた後は、pHを調節して増殖速度を調節すると同時に、回分培養の場合と同様の方法で培養液中の残存メタノール濃度が一定となるように培地、又はメタノールの供給量を制御する。このようにして、一定の通気条件下で一定の定常状態が得られ、この定常状態においては菌の増殖を制限しているのはpHのみである。

【0017】本発明のpH制限下での連続培養に先立って、菌を活発に増殖させて培養液中の菌濃度が所定値と

なるまで予備培養が行われる。予備培養として、たとえば基質およびその他の培地成分ならびに酸素を十分に供給しつつ行われる回分培養、もしくはpHのみを低くして行われる回分培養、またはこれらの回分培養に引き続いて基質およびその他の培地成分を十分に供給しつつ至適pHで行われる連続培養などがある。予備培養は通常の方法により行われ、培養温度、基質および培地成分ならびに培地もしくは培養液中の基質濃度などは前記の通りである。

【0018】予備培養に引き続き、前記のpHを制限した連続培養が行われる。本発明における連続培養初期における培養液中の菌体濃度（乾燥菌体基準、以下同様）は特に制限はないが、通常は本発明の定常状態時の菌体濃度と同程度か、やや低い濃度に到達したのち本連続培養へ移行することが望ましい。また、本発明における連続培養中における培養液中の菌体濃度は通常10~100g/lである。

【0019】連続培養中における菌の増殖速度を変えるには、設定pHを変更することにより任意に変更できる。すなわち増殖速度を速くするには設定pHをより高くするように条件を選択すればよく、逆に増殖速度を遅くするには設定pHをより低くするように条件を選択すればよい。設定pHを低くし、培養槽での平均滞留時間が長くなるに伴ない菌体中のPHB含有量は増加し、平均滞留時間を15時間以上とした時に飛躍的なPHB含有量の増加が認められる。

【0020】このようにして得られた培養液から、濾過または遠心分離などの通常の固液分離によって菌体を分離回収し、必要に応じて水などで洗浄して菌体を得る。このようにして得られた菌体から、又は、さらに所望により超音波処理などで破壊された菌体から、たとえばクロロホルム、1,2-ジクロロエタンなどのハロゲン化炭化水素を抽剤として抽出して得られたPHB抽出液から、これと貧溶媒とを混合するなどにより凝固沈澱させるなどのそれ自体公知の手段で処理してPHBを分離する。必要に応じてさらに精製して高純度のPHBを得ることができる。

【0021】

【実施例】次に本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

#### 実施例1

プロトモナス エクストルクエンズ (*Protomonas extorquens*) K (微工研菌寄第8395号)を使用した。なお、最近の文献によれば本菌は、メチロバクテリウム (*Methylobacterium*) 属に属するとされている (I.J. Bo usfield and P.N.Green; Int.J.Syst.Bacteriol., 35, 209 (1985), T.Urakami et al.; Int.J.Syst.Bacteriol., 43, 504-513 (1993))。

【0022】工業用水1L当たり、つぎの組成を有する

回分培養用培地（培地A）を調製した。

回分培養用培地の組成（培地A）

メタノール	2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1 g
酵母エキス	0.2 g
FeC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>7</sub> · xH <sub>2</sub> O	60 mg
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	20 mg
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	10 mg
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	40 mg
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	1 mg
KI	1 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1 mg
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1 mg
NaCl	50 mg

【0023】3L容培養槽に、この培地Aを1.5L張り込み、120℃で20分間加熱滅菌し、冷却後、アンモニア水でpH5.5に調整し、これに別に調製された種母200mlを植菌し、空気を通気しつつ32℃で回分培養を行った。回分培養時のpHは、10%アンモニア水で5.5に自動制御した。培養液中のメタノール濃度は、ガスクロマトグラフィにより連続的に測定し、500~1500ppmの範囲になるように自動的にメタノールを供給した。なお、攪拌機回転数を1000rpm、通気量を1vvmとした。若干のラグタイムの後、対数的に増殖した。菌体濃度36g/lまで培養を継続したがこの間の比増殖速度は0.049h<sup>-1</sup>（世代時間14.1時間）であり、至適pH（6.6）における最大比増殖速度0.23h<sup>-1</sup>の21%に抑制されていた。培養結果を表1に示した。表1は培養時間と菌体濃度、PHB含有量の関係を示している。PHB含有量は全培養期間を通じ約40%と一定であった。培養液中の各種ミネラルイオン類をイオンクロマトグラフィで経時的に測定したが、いずれの成分も不足のものはなかった。

【0024】

【表1】

(5)

特開平7-155192

表1

培養時間 (hr)	菌体濃度 (g/l)	PHB含有量 (%)
36	4.1	39.4
44	6.0	42.3
55	12.6	38.1
62	15.6	41.6
69	24.5	39.5
78	35.9	38.5

【0025】PHBの分析は以下により行った。菌体を遠心分離機で集菌した後、純水で2回洗浄し、これを熱風乾燥(100℃)して乾燥菌体を得た。約80mgの乾燥菌体をスクリーキャップ付き試験管にとり、クロロホルム1ml、内部標準入りメタノール-硫酸溶液(内部標準:安息香酸200mg/100ml、硫酸3.5容量%)1mlを加え、120℃で90分加熱処理し、菌体に含まれているポリマーの分解およびメチルエステル化を行った。反応終了後純水を1ml加え、激しく攪拌した後、遠心分離を行い有機溶媒層を得た。この有機溶媒層をガスクロマトグラフィーで分析することにより、PHB成分含量を算出した。

ガスクロマトグラフィー分析条件

装置:島津GC-7AG

カラム:Reoplex 400 chromosorb G

AW-DMCS 10% (60~80mesh)

カラム温度: 160℃

注入口温度: 250℃

【0026】比較例1

培養時のpHを6.6に変えたほかは、実施例1と同様にして菌を培養した。培養結果を表2に示した。植菌後\*

表3

培養時間 (hr)	菌体濃度 (g/l)	PHB含有量 (%)	pH
20	2.3	2.8	6.0
23	4.2	3.0	6.0
27	9.8	4.1	6.0
29	15.0	3.3	6.0
41	20.6	12.1	5.2
56	28.2	35.5	5.2
74	35.6	47.7	5.2
97	40.4	55.3	5.2

【0030】実施例3

プロトモナス エクストルクエンシス(Protomonas exto

\*まもなく対数的に増殖した。菌体濃度30g/lまで培養を継続したが、本培養における比増殖速度は、0.23h<sup>-1</sup>(世代時間3.0時間)であった。PHB含有量は全培養期間を通じ4%以下であった。

【0027】

【表2】

表2

培養時間 (hr)	菌体濃度 (g/l)	PHB含有量 (%)
17	1.0	4.0
25	6.0	2.7
29	15.0	1.0
32	32.0	2.3

【0028】実施例2

培養時のpHを6.0に変えたほかは、実施例1と同様にして菌を培養した。植菌後まもなく対数的に増殖した。pH6.0での比増殖速度は、0.206h<sup>-1</sup>(世代時間3.4時間)であった。菌体濃度15g/lとなったところで、設定pHを5.2に変更した。pHの低下に伴ない比増殖速度は、次第に遅くなり最終的には0.004~0.005h<sup>-1</sup>(世代時間140~170時間)となった。培養時間と菌体濃度、PHB含有量の結果を表3に示した。PHB含有量はpH6.0では、3~4%と低いのがpH5.2に変更後、次第に上昇し、最終的には約55%に上昇した。培養液中の各ミネラルイオンをイオンクロマトグラフィーで経時的に測定したが、いずれの成分も不足のものはなかった。

【0029】

【表3】

quens) K(微工研菌寄第8395号)を使用した。3L容培養槽に、培地Aを1.5L張り込み、120℃で

20分間加熱滅菌し、冷却後、アンモニア水でpH6.5に調整し、これに別に調製された種母200mlを植菌し、空気を通気しつつ33℃で回分培養を行った。回分培養時のpHは、25%アンモニア水で6.5に自動制御した。培養液中のメタノール濃度は、ガスクロマトグラフィにより連続的に測定し、500~1500ppmの範囲になるように自動的にメタノールを供給した。攪拌機回転数を1450rpm、通気量を1vvmとした。菌体濃度が約10g/lに達した時点で、設定\*

連続培養用培地組成 (培地B)

メタノール  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
 $\text{FeC}_2\text{H}_3\text{O}_7 \cdot x\text{H}_2\text{O}$   
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   
 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$   
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$   
 $\text{KI}$   
 $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$   
 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   
 $\text{H}_3\text{BO}_3$   
 $\text{NaCl}$

消泡剤 (Silicone KM-75)

【0032】培養液中のメタノール濃度は、メタノールの損失を少なくするため、可能な限り低くし、300~500ppmに制御した。連続培養へ移行後、増殖速度が次第に低下し、平均滞留時間が約40時間で定常状態となった。イオンクロマトグラフィで培養液中の各ミネラルイオン濃度を連続的に測定したが、いずれの成分も不足のものはなかった。この条件で10日間培養を継続したが、培養結果は安定していた。この時の培養液中には約52%のPHBを含んだ菌体が1L当り21g存在した。メタノール1g当りの菌体収量は0.35gであ\*

表4

pH	平均滞留時間 (hr)	PHB含有量 (%)
6.6	4.3	2.5
6.0	5.0	4.3
5.7	15.1	29.8
5.5	20.6	40.2
5.3	40.2	52.0

【0034】

【発明の効果】本発明によりPHBを、大規模に、しかも経済的かつ安定的に生産することが可能となった。本発明によるPHB生産は、培養pHを低下させるのみで

\* pHを5.5に変更すると同時に、別に調製された連続用培地(培地B)の連続供給と培養液の連続排出を開始し、連続培養に移行した。培養pHは、10%アンモニア水を使用し5.3に自動的に制御した。連続用培地の組成は、下記のごとくであり、120℃で20分間加熱滅菌し、冷却後使用した。ただしメタノールは、ミクロフィルターで除菌濾過して注入した。

【0031】

工業用水1L当り

60 g  
 3 g  
 1 g  
 1 g  
 60 mg  
 20 mg  
 10 mg  
 40 mg  
 1 mg  
 1 mg  
 1 mg  
 1 mg  
 1 mg  
 50 mg  
 1 g

※り、PHBの収量は0.18gであった。その後、培養pHを変更することにより平均滞留時間を変更し、平均滞留時間とPHB含有量との関係を調べた。結果を表4に示した。設定pHを低くし培養槽での平均滞留時間が長くなるに伴ない菌体中のPHB含有量は増加し、平均滞留時間を15時間以上とした時に飛躍的なPHB含有量の増加が認められた。

【0033】

【表4】

ある簡単な操作で行われるので、最適条件に設定した後の運転管理が容易であり、従来の培地ミネラル成分を制限して行うプロセスに比べ、飛躍的な省力化がはかれる。原料(基質)がメタノールであるので、原料コスト



が非常に安価となるが、基質がメタノールである更によ  
い点は、非常に限定された基質であるため、一般性細菌\*

\*による雑菌汚染がなく、長期間の安定した培養が容易に  
継続できることにある。

---

フロントページの続き

(72)発明者 田原 寅一

新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱  
瓦斯化学株式会社新潟研究所内

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**